动 物 学 研 究 2006，Apr. 27（2）：181－188 CN 53－1040/Q ISSN 0254－5853
Zoological Research

三种猫科动物 MHC Class Ⅱ DRB 等位基因序列变异性分析

王 倩，吴孝兵*，晏 鹏
（安徽师范大学 生命科学学院 重要生物资源保护与利用安徽省重点实验室，安徽 芜湖 241000）

摘要： 分析了云豹（*Neofelis nebulosa*）、豹（*Panthera pardus*）和东北虎（*Panthera tigris altaica*）等 3 种猫科动物的主要组织相容性复合物 Class Ⅱ DRB 座位的等位基因序列变异性。使用一对简并性引物扩增了 DRB 座位第二外元目标片段。用单链构像多态性分析方法确定不同的单倍型。每个个体挑出 15 个单克隆用来分离、纯化和测序。实验中从 4 个个体中获得了 8 种不同序列。237 bp 核苷酸序列中发现有 59 个变异位点。根据人类的抗原肽结合区推测 79 个氨基酸位点中存在 21 个假定的抗原肽结合位点，而且非同义替换率明显高于同义替换率，这可能说明了第二外元的较高变异性是由平衡选择作用来维持的。重建的 NJ 树和 MP 树显示豹和东北虎的亲缘关系较近，而两者与云豹的亲缘关系较远。

关键词： MHC 基因；DRB 座位；第二外元；猫科动物；变异性
中图分类号： Q959.838；Q959.838.03 **文献标识码：** A **文章编号：** 0254－5853（2006）02－0181－08

Sequence Variability Analysis of MHC Class Ⅱ DRB Alleles in Three Felines

WANG Qian，WU Xiao-bing*，YAN Peng
(Anhui Key Laboratory of Conservation and Exploration for Important Bioresources，College of Life Sciences，Anhui Normal University，Wuhu 241000，China)

Abstract: The variation of the exon 2 of the major histocompatibility complex (MHC) class Ⅱ gene DRB locus in three feline species were examined on clouded leopard (*Neofelis nebulosa*), leopard (*Panthera pardus*) and tiger (*P. tigris altaica*). A pair of degenerated primers was used to amplify DRB locus covering almost the whole exon 2. Exon 2 encodes the β1 domain which is the most variable fragments of the MHC class Ⅱ molecule. Single-strand conformational polymorphism analysis was applied to detect different MHC class Ⅱ B haplotypes. Fifteen recombinant plasmids for each individual were screened out, isolated, purified and sequenced. Totally eight sequence haplotypes of exon 2 were obtained in 4 individuals. Within 237 bp nucleotide sequences from 4 samples, 30 variable sites were found, and 21 putative peptide-binding sites were disclosed in 79 amino acid residues. The ratio of nonsynonymous substitutions (d_N) was much higher than that of synonymous substitutions (d_S), which indicated that balancing selection probably maintain the variation of exon 2. MEGA neighbor joining and PAUP maximum parsimony methods were used to reconstruct phylogenetic trees among species, respectively. The results displayed a more close relationship between leopard and tiger; however, clouded leopard has a comparatively distant relationship from the other two.

Key words: MHC; DRB locus; Exon 2; Feline; Variability

主要组织相容性复合体（major histocompatibility complex，MHC）是脊椎动物体内与机体自身免疫功能密切相关的一个基因家族（Klein，1986），经研究发现，MHC 基因家族可分为两个主要的亚基因家族：Ⅰ类（ClassⅠ）和Ⅱ类（ClassⅡ）基因（Bernatchez & Landry，2003）。在哺乳动物和鸟类中这两个主要亚基因家族之间彼此紧密相连（Hughes & Yeager，1998；Hess & Edwards，2002；

* 收稿日期：2005－11－03；接受日期：2006－01－10
基金项目：安徽省优秀青年基金资助项目（04043049）；生物环境与生态安全安徽省高校重点实验室、安徽省学术与技术带头人专项基金及安徽省教育厅自然科学研究项目（2005KJ182）基金资助
* 通讯作者（Corresponding author），E-mail：wuxb@mail.ahnu.edu.cn

Kennedy et al，2002）；但两者在自身结构组成和功能（Abbas，1991）以及进化（Nei & Hughes，1991）等方面都有所不同。MHC Ⅱ类基因的第二外元的多态性水平较高，所以目前大多数有关MHC 的研究都侧重于Ⅱ类基因的第二外元的多态性（Shia et al，1995），已有的相关研究大多关注于此（Kennedy et al，2002）。

猫科动物 MHC 基因研究中得到较多关注的是小型猫科动物，如家猫（*Felis catus*）（Kuwahara，2000；Yuhki & O'Brien，1997；Kennedy et al，2002）以及虎猫（*Leopardus pardalis*）和长尾虎猫（*Leopardus wiedii*）（Yuhki et al，2000）。较大型猫科动物中，Drake et al（2004）曾对印度豹（*Acinonyx jubatus*）MHC 基因 DRB 座位第二外元的序列多样性进行了一些研究。除以上提及外，在其他大型猫科动物中开展的相关研究到目前为止还比较少。中国大陆现有 13 种野生猫科动物，其中东北虎、豹和云豹均为国家一级保护动物，同时也被 IUCN 列为濒危级或易危级保护种类（Wang et al，1998）。然而过去对于猫科动物所作的研究工作大多关注于生态学（Nowell et al，1996）和系统进化及分类方面（Janczewski et al，1995；Masuda et al，1996；Johnson & O'Brien，1997；Slattery & O'Brien，1998；Zheng et al，2005），对于物种的遗传多样性研究工作国内开展得相对较少，而从 MHC 基因角度去探讨这些濒危物种的遗传多样性研究工作就更显薄弱，然而这些珍稀物种的生存现状又要求人们去了解其遗传多样性水平。基于以上原因，本研究从云豹（*Neofelis nebulosa*）、豹（*Panthera pardus*）和东北虎（*Panthera tigris altaica*）MHC Class Ⅱ基因 DRB 座位第二外元序列出发，对这 3 个物种之间以及种内变异性进行分析，期望初步了解 MHC 基因在不同物种之间以及物种内部的变异特征，为物种保护措施提出、制定和实施提供一些科学依据。同时本文还从 MHC 基因角度浅析了此 3 种猫科动物的系统分类关系。

1 材料与方法

1.1 实验材料

共使用 4 个样品（均为 − 80 ℃冻存肌肉组织），分别为：云豹 2 个样品（采自安徽宁国；编号 MA99019，MA99023）、豹 1 个样品（采自安徽黟县；编号 MA049020）和东北虎 1 个样品（安徽宁国标本厂提供；编号 MA99017）。

1.2 实验方法

1.2.1 总 DNA 的提取 取约 0.2 g 肌肉组织，采用标准 SDS/蛋白酶，酚/氯仿方法提取基因组 DNA（Sambrook & Russell，2001）。提取的 DNA 用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.2 目标片段的扩增 参照 Yuhki & O'Brien（1997）实验中使用的简并性引物扩增 3 种猫科动物MHC Class Ⅱ基因 DRB 座位第二外元目标片段，上下游引物分别为：FDF：5′-CCACACAGCACGTTTC（C/T）TG-3′；FDR：5′-CCGCTGCACTGTGAAGCT-3′。PCR 反应总体积为 30 μL，体系中包含 10 mmol/L Tris-HCl（pH 8.3），1.5 mmol/L $MgCl_2$，50 mmol/L KCl，150 μmol/L dNTP，上下游引物各 10 μmol/L，20～100 ng 模板 DNA，1 U *Taq* DNA 聚合酶，体积不足部分由灭菌 ddH_2O 补齐。反应程序为：94 ℃变性 50 s，54 ℃退火 50 s，72 ℃延伸 50 s，34 个循环；第一个循环之前 94 ℃预变性 5 min，循环结束后继续后延伸 10 min。PCR 产物使用 1% 琼脂糖凝胶电泳，在 UVP 紫外凝胶成像系统下检测。

1.2.3 克隆 PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳分离后，将所需片段从凝胶中切下，并用 DNA 凝胶回收试剂盒回收纯化，溶解于 15 μL 灭菌 ddH_2O 中。将纯化的 PCR 产物连接到 pMD18-T 载体上，然后转化进 *E. coli* DH5α 感受态细胞。得到的重组菌落经过蓝白斑初步筛选后（每个个体挑取 15 个单克隆），用 M13 通用引物进行菌落 PCR 验证阳性克隆。

1.2.4 SSCP 分析 采用 SSCP 方法来鉴定不同的单倍型。将 5 μL 菌落 PCR 产物、2 μL 双指示剂和 4 μL 甲酰胺加入 0.2 mL Ep 管中并混均匀，然后置于 95 ℃水浴锅中变性 10 min，随后立即放入冰水混合物中 5 min。将 10 μL 混合液加入点样孔，室温下用 6% 非变性聚丙烯酰胺垂直板凝胶进行电泳，电泳缓冲液为 1×TBE，300 V 电压下电泳 6 h 左右后用硝酸银染色，照相并分析比较结果。

1.2.5 测序和数据分析方法 阳性克隆经 SSCP 分析检测出所有差异片段后，将差异片段的菌液送有关生物技术公司进行测序。测序所得核苷酸序列经 GenBank 中 BLAST 比对，验证序列的正确性。所有序列由 Clustal X（Jeanmougin et al，1998）软件进行比对，同时辅以人工校对，以便找出序列差异和变异位点。核苷酸和氨基酸序列的统计分析利用 MEGA Version 2.1（Kumar et al，2001）和DnaSP4.0

（Rozas et al，2003）软件来完成。

MEGA 软件中 Kimura 双参数（Gamma）法计算序列之间的遗传距离（标准误），同时还计算序列的转换（transition）和颠换（transversion）数（率）。序列中的同义（d_S）和非同义（d_N）替换相对比例通过 MEGA 软件中用 Jukes-Cantor（1969）校正的修正 Nei & Gojobori（1986）方法计算（Nei & Kumar，2000）。以上统计结果用 Z－检验法进行显著性检验（$P < 0.05$）。抗原肽结合位点的选择基于人的 HLA Ⅱ类分子中组成 PBR 的 24 个密码子（Brown et al，1993）。每个氨基酸变异位点的杂合度按照 Hedrick et al（1991）方法计算。具体公式为 $H_T = 1 - \sum_{i=1}^{k} P_i^2$，这其中 H_T 表示杂合度；P_i 为某种氨基酸在该位点上的出现频率；k 代表出现在此位点上的氨基酸种数。

利用 MEGA 软件中基于 Nucleotide：Jukes-Cantor 模型的邻接法（neighbor joining，NJ）构建系统发生树（自举检验重复 1 000 次）。同时利用 PAUP4.0（phylogenetic analysis using parsimony）软件（Swofford，1998）中最大简约法（maximum parsimony，MP），使用启发式搜索算法（heuristic search）构建最大简约（MP）树。构建系统发生树时使用了从 GenBank 上获得的其他物种的同源序列，包括有印度豹（*Acju-DRB*，AY312962）、东北虎猫（*Lepa-DRB*，AF057836）、家猫（*Feca-DRB*，U51983）、狗（*Cafa-DRB*，X93572）。

2　结果与分析

2.1　序列变异性分析

从 4 个样品中总共获得了 8 种不同的核苷酸序列，长度均为 237 bp，其中仅东北虎样品只获得了 1 种序列，为了验证该结果的可靠性，我们又对该片段的 PCR 产物进行了直接测序，测序结果与克隆测序得到的序列是一致的；豹和云豹分别得到 3 种和 4 种序列。根据 MHC 分子的命名规则，将云豹所获序列分别命名为 *Nene-DRB* *1、*Nene-DRB* *2、*Nene-DRB* *3 和 *Nene-DRB* *4；东北虎所获序列命名为 *Pati-DRB* *1；豹所获序列分别命名为 *Papa-DRB* *1、*Papa-DRB* *2 和 *Papa-DRB* *3。以上序列均已提交到 GenBank（登录号：DQ189257-DQ189264）。

豹 3 种核苷酸序列中 T、C、A 和 G 平均含量分别为16.3、22.8、22.1 和 38.8%，发生 1 次颠换，没有转换事件发生；东北虎序列中 T、C、A 和 G 的含量分别为18.1、21.1、22.4 和 38.4%；云豹 4 种序列中 T、C、A 和 G 平均含量分别为 19.5、21.6、23.0 和 35.9%，有 8 个简约信息位点，发现转换 8 个，颠换 10 个，其中有 1 个转换颠换兼具位点。8 种不同序列中 T、C、A 和 G 平均含量分别为 18.1、22.0、22.6 和 37.3%，简约信息位点 35 个。物种间各个碱基含量之间差异不大，但是云豹的转换/颠换发生频率要明显高于其他物种，这也使得云豹序列间的变异程度变大。

经核苷酸序列比对分析，8 种序列中有 59 个变异位点，变异位点中替换发生在密码子第 1、2 和 3 位的分别有8、8 和 9 个，各占 32.0、32.0 和 36.0%，其中转换 10 个，颠换 15 个，没有发现转换颠换兼具位点。Kimura 双参数计算 8 种序列的遗传距离差异从 0.4% 到 19.1% 不等，平均为 11.7%（表 1）。物种内序列间遗传距离差异最大值出现在 *Nena-DRB* *1 与 *Nena-DRB* *3 间，为 0.109，而最小值出现在 *Papa-DRB* *2 和 *Papa-DRB* *3 序列间，为 0.004。物种间序列遗传距离差异最大值出现在 *Nena-DRB* *3 和 *Papa-DRB* *3 序列间，为 0.191，物种间序列遗传距离差异最小值出现在 *Pati-DRB* *1 和 *Papa-DRB* *2 及 *Papa-DRB* *3 序列间，均为 0.085。遗传距离分析显示了云豹的序列间变异性要远高于豹和东北虎的序列，而豹和东北虎之间的遗传距离关系较近。

通过 DnaSP4.0 软件计算核苷酸和氨基酸多态位点数以及多样性。表 2 中列出了序列间多态位点数、突变位点数、核苷酸差异平均值和核苷酸多样性值，其中的各项数据明显反映出云豹的 4 种序列间变异较大，而豹的 3 种序列间仅能通过 2 个鉴别位点而加以区分。8 种序列中共发现了 59 个核苷酸多态位点，占总数的 33.47%；简约信息位点 35 个，占总数的 14.5%。79 个氨基酸残基中有 30 个氨基酸多态位点，占总数的 38%。没有发现豹与云豹序列间共享任何突变位点。豹与云豹间序列核苷酸多样性平均值为 24.286，核苷酸多样性（Pi）为 0.102 5。两物种间每位点的核苷酸替代数（D_a）为 0.141 0，而核苷酸替代平均值（D_{xy}）为 0.101 3。

因为确切的抗原肽结合区域（peptide-binding region，PBR）在猫科动物中还没有进行定位，所以依据人类 HLA Ⅱ类分子的抗原肽结合区域确定

了本研究所获序列中假定的抗原肽结合区域（putative peptide-binding region，p-PBR）（Brown et al，1993）。表3列出了3种动物物种内部以及全部8种不同序列间的假定的抗原肽结合区域和假定的非抗原肽结合区域的非同义替换、同义替换以及非同义替换与同义替换之比（由于东北虎仅获得1种序列，所以无法得到其物种内部的上述数据）。从表3中可以看出，在云豹的假定PBR区域的同义替换 d_N 要远高于非同义替换，其 d_N/d_S 达到2.595。而在假定Non-PBR区域的同义替换却显著低于非同义替换（$P=0.019$）。

在8种氨基酸序列中共发现30个变异位点，其中杂合度最大值出现在第20位氨基酸上，为0.91，而最小值出现在第52位氨基酸上，为0.051 2。平均杂合度为0.441 5（图1）。上方用星号标记的是发生变异的假定抗原肽结合位点，共有14个，杂合度最大和最小值均出现在此类位点上，这两个最值之差为0.859，远高于平均杂合度。这说明在

表1 8种核苷酸序列的遗传距离及其标准误

Tab. 1 Genetic distances and their standard errors among eight nucleotide sequences

	1	2	3	4	5	6	7	8
1. *Papa-DRB* * 1		0.004	0.006	0.020	0.029	0.029	0.031	0.023
2. *Papa-DRB* * 2	0.004		0.004	0.020	0.029	0.028	0.031	0.022
3. *Papa-DRB* * 3	0.009	0.004		0.020	0.029	0.029	0.031	0.023
4. *Pati-DRB* * 1	0.090	0.085	0.085		0.029	0.029	0.030	0.025
5. *Nene-DRB* * 1	0.170	0.165	0.170	0.170		0.004	0.023	0.019
6. *Nene-DRB* * 2	0.164	0.159	0.164	0.164	0.004		0.022	0.019
7. *Nene-DRB* * 3	0.191	0.186	0.191	0.181	0.109	0.104		0.022
8. *Nene-DRB* * 4	0.109	0.104	0.109	0.129	0.090	0.075	0.099	

表中对角线以下为遗传距离，对角线以上为标准误（Numbers below the diagonal are genetic distances and numbers above the diagonal are standard errors）。

表2 三物种遗传参数

Tab. 2 Genetic parameter of three species

	豹 *Panthera pardus*	云豹 *Neofelis nebulosa*	东北虎 *Panthera tigris altaica*	全部序列 Total sequences
多态位点数量 Polymorphic positions	2	31	0	59
突变位点数量 Mutant positions	2	33	0	65
核苷酸差异平均值 Nucleotide differences（*K*）	1.333 3	17.500 0	0.000 0	25.178 6
核苷酸多样性 Nucleotide diversity（*Pi*）	0.005 6	0.073 8	0.000 0	0.106 2

表3 3种动物假定的PBR位点和Non-PBR位点的同义和非同义替换率、d_N/d_S 比率和 *P* 值

Tab. 3 Comparasion of the rate of non-synonymous（d_N）and synonymous（d_S）substitutions for the putative PBR and non-PBR and their ration among three species

物种 Species	位置 Positions	密码子数 Codons	非同义替换 Non-synonymous（d_N）	同义替换 Synonymous（d_S）	d_N/d_S	*P*
云豹 *Neofelis nebulosa*	PBR	21	0.109±0.041	0.042±0.035	2.595	0.198（ns）
	Non-PBR	58	0.044±0.016	0.152±0.034	0.289	0.019
	All	79	0.061±0.016	0.122±0.034	0.5	0.091（ns）
豹 *Panthera pardus*	PBR	21	0.172±0.070	0.178±0.107	0.966	0.322（ns）
	Non-PBR	58	0.091±0.035	0.035±0.019	2.6	0.325（ns）
	All	79	0.113±0.031	0.066±0.024	1.712	0.147（ns）
东北虎 *Panthera tigris altaica*	PBR	21	—	—	—	—
	Non-PBR	58	—	—	—	—
	All	79	—	—	—	—
全部序列 Total sequences	PBR	21	0.250±0.069	0.113±0.066	2.212	0.085（ns）
	Non-PBR	58	0.072±0.020	0.113±0.032	0.637	0.266（ns）
	All	79	0.116±0.022	0.112±0.026	1.036	0.909（ns）

抗原肽结合区的氨基酸变异程度要大于非抗原肽结合区。

2.2 系统发生分析

由物种内不同序列间以及不同物种间的 NJ 系统发生树（图 2）可以看出，8 种序列分为两大支。分支 A 由 *Pati-DRB* * 1、*Papa-DRB* * 1、*Papa-DRB* * 2 和 *Papa-DRB* * 3 组成，表明豹和东北虎之间可能有着较近的亲缘关系；而云豹的 *Nene-DRB* * 1 ~ 4 序列组成了分支 B。

从 GenBank 下载同源序列后，以狗 *Cafa-DRB*（X93572）作为外群，构建 NJ 树（图 3），和 MP 树（图 4）。NJ 树中 *Pati-DRB* * 1、*Papa-DRB* * 1、*Papa-DRB* * 2 和 *Papa-DRB* * 3 构成了分支Ⅱ，其余猫科动物序列构成了分支Ⅰ。与 NJ 树相同，MP 树中 *Pati-DRB* * 1、*Papa-DRB* * 1、*Papa-DRB* * 2 和 *Papa-DRB* * 3 也聚为一支形成分支Ⅱ，但是分支Ⅰ组成较为复杂，*Nene-DRB* * 1 和 *Nene-DRB* * 2 组成一小分支，而 *Nene-DRB* * 3、*Acju-DRB* 和 *Lepa-DRB* 组成另一小分支，两小分支合并 *Nene-DRB* * 4 组成一较大分支后连同 *Feca-DRB* 共同组成分支Ⅰ。

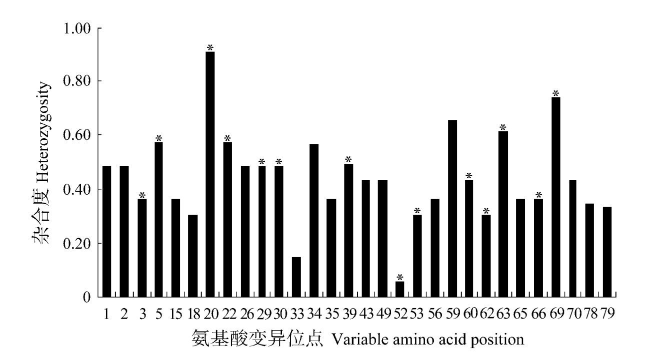


图 1　8 种氨基酸序列变异位点的平均杂合度

Fig. 1　Average heterozygosity of the variable amino acid positions among eight different sequences

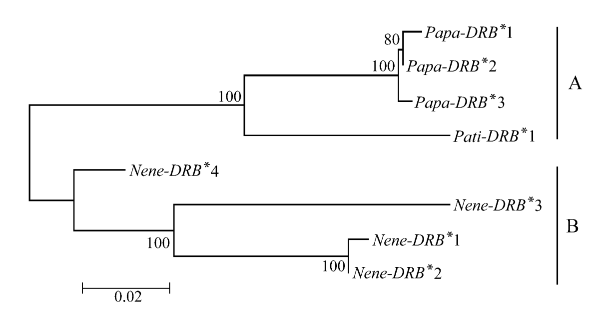


图 2　基于 8 种序列构建的 NJ 树，各分支上数字为 Bootstrap 1 000 次循环的自举检验值

Fig. 2　NJ tree based on the 8 sequences of MHC DRB gene exon 2 with confident values of Bootstrap 1 000 indicated above each branch

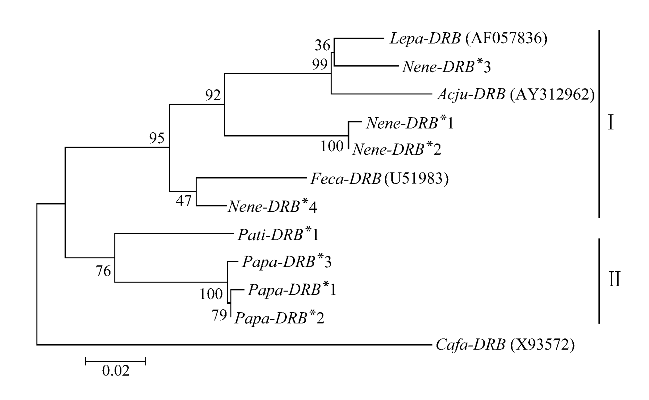


图 3　基于 MHC DRB 基因第二外元序列构建的 NJ 树，各分支上数字为 Bootstrap 1 000 次循环的自举检验值

Fig. 3　NJ tree based on the 8 sequences of MHC DRB gene exon 2 with confident values of Bootstrap 1 000 indicated above each branch

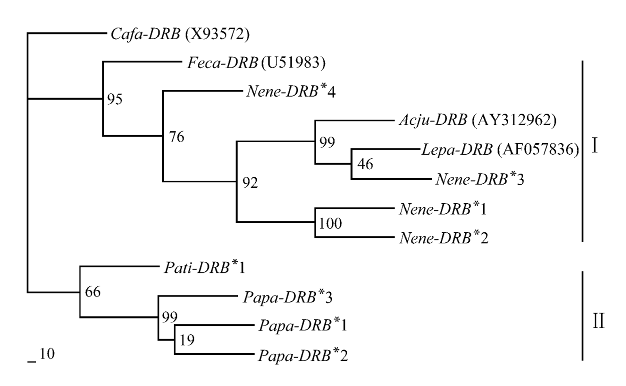


图 4　基于 MHC DRB 基因第二外元序列构建的 MP 树，各分支上数字为 Bootstrap 1 000 次循环的自举检验值

Fig. 4　MP tree based on the sequences of MHC DRB gene exon 2 with confident values of Bootstrap 1 000 indicated above each branch

3 讨　论

3.1 3 个物种 MHC Class Ⅱ DRB 基因序列变异性

克隆测序和 PCR 产物直接测序的结果表明，东北虎肌肉 DNA 中仅存在 1 种 MHC Class Ⅱ DRB 基因序列。Russello et al（2004）的研究证明 20 世纪 40 年代的种群瓶颈效应使得目前东北虎的 mtDNA 基因控制区单倍型多样性降到了极低的水平，另外在印度豹（O'Brien et al，1983）和狮子"*Panthera leo*"（Packer et al，1991）种群中也发现了类似的情况。MHC 基因的变异性水平被认为是种群抵御疾病和寄生虫以及生存力的重要指标，对于种群的维持可能具有极为重要的意义（O'Brien & Evermann，1988）。本研究在云豹和豹物种中均得到了多种不同序列，而且是在相对较少的个体中发现

的，这可能说明这两者 MHC-DRB 基因的变异水平较高，而较高的变异性对这两个物种的生存延续可能有着积极的意义。当然，不同的学者所得出的研究结论有所出入，如 Aguilar et al（2004）在圣尼古拉斯岛狐（*Urocyon littoralis dickeyi*）较小的种群中发现了高度的 MHC 基因变异性，而 Mikko et al（1995）却在欧洲和北美驯鹿（*Alces alces*）种群中发现了极低的 MHC 多样性。也正因为如此，豹和云豹的 MHC 种群遗传多样性程度还需要进一步研究来阐明。

所有 8 种氨基酸序列均在第 7 和第 71 位（总共 79 个氨基酸残基）出现半胱氨酸（cysteine），这是 DR 分子正确折叠必要前提，序列中没有出现任何缺失/插入或终止子，这表明序列有可能形成功能区域，从而能够在体内承担某种生理功能（Schaschl et al，2004）。同一个体中发现多个不同序列，这说明这些序列不是来自于同一个基因座位，而可能是存在基因座位重复现象。这一现象在 Nino-Vasquez et al（2000）和 Elizabeth et al（2000）的研究中也有报道，而且可能正是基因座位的重复以及座位上基因的多态性使得基因产物的多样性增加，从而使机体能够在内或外界抗原引起的免疫应答中发挥作用。

在 79 个氨基酸残基中包含有 21 个假定 PBS 位点，对其进行分析后发现其中有 14 个假定 PBS 位点发生变异，占 66.7%；而在剩余的其他 58 个假定的 Non-PBS 位点中仅有 16 个发生变异，占 27.6%，明显地，发生在抗原肽结合区域的氨基酸替换事件要远高于发生在非抗原肽结合区域。在全部 8 种序列中假定 PBS 位点中非同义替换率明显高于同义替换率（$d_N/d_S = 2.212$）。各物种（东北虎除外）内部氨基酸序列的假定的 PBR 区域 d_N/d_S 值均大于或接近于 1，这表明氨基酸替换更集中地发生在抗原结合区域附近。

本研究的云豹假定 PBR 区域 d_N/d_S 为 2.212，远大于 1。在不考虑 PBR 和 Non-PBR 区域的情况下，豹的 d_N/d_S 为 1.712，也远高于 1，同样在不考虑 PBR 和 Non-PBR 区域的情况，合并 8 种序列后，d_N/d_S 为 1.036，也大于 1。这说明非同义位点的进化速度要高于同义位点，这一特点也可能使得新的基因变异产生和多态性增加有了先决的因素，也为 MHC 基因适应同样不断变化的抗原创造了条件。

本研究云豹和豹的序列无论是从核苷酸和氨基酸序列位点的变异去看，还是从非同义替换与同义替换之比来说，都显示这两种动物的 MHC Class Ⅱ 基因 DRB 座位第二外元存在高度的变异性。目前认为，MHC 基因变异性水平与生物所承受的选择压力有紧密的联系，而选择压力又可能因为生物生存环境和接触的抗原不同而有所不同。已有的研究表明，海洋哺乳动物的 MHC 基因的变异性要小于陆生哺乳动物（Hoelzel et al，1999；Murray et al，1995）。这是因为与陆地环境相比，海洋环境中的各种病原微生物和传染性疾病都较少，因而所面临的选择压力也较小；陆地环境复杂多变，要生存就必须适应环境，热带地区由于寄生虫给寄主造成的选择压力要高于其他地区。这使得抗原的选择压力增大，因此热带地区的动物 MHC 基因的变异性普遍维持着较高的水平（Westerdahl et al，2000）。

3.2 系统发生

Hedrick et al（2002）曾通过 MHC Class Ⅱ DRB1 座位基因来分析红狼（*Canis rufus*）、北美丛林狼（*Canis latrans*）和灰狼（*Canis lupus*）之间的系统发生关系。本文也尝试通过 MHC 基因的序列分析 3 种猫科动物的系统关系，但根据图 2、3、4 的聚类结果显示，与 Slattery et al（1998）和 Zheng et al（2005）的结果并不一致。究其原因可能是因为 MHC 是一个多态性和相对保守性兼具的基因家族，也许正是这种特性导致了本研究中的结果与多位研究者的结论有所区别，这在 Crespi et al（2004）研究中也有所体现，同时由于到目前为止猫科动物的 MHC 相关研究还不多，可以放在一起进行类比的物种还比较少；而且由于 MHC 基因是一个多基因家族，可能由于所获得序列并非来自直源同源基因而使基因树不能完全反映物种树，而且基因本身的进化改变也受随机误差和某些自然选择因素的影响，所以要评价基因树或物种树时，需要尽可能的使用多个基因（Nei & Kumar，2000）。因而作者认为单一的 MHC 基因可能难以解决物种间的系统发生关系。

3.3 云豹 MHC Class Ⅱ DRB 基因的跨种多态性

无论是 NJ 树还是 MP 树中云豹的序列均与其他的几种猫科动物序列聚成一大支，但是云豹的不同序列之间却不因为是同一物种而相互紧密地聚在一起，然后再与其他猫科动物序列聚合，相反是松散的与其他物种序列混合在一起。分析这种情况可

能是因为 MHC 基因的跨种多态性（trans-species polymorphism）在起作用。所谓跨种多态就是不同物种拥有相同或相似的等位基因谱系。大多数学者认为跨种进化学说（trans-species evolution）应该是到目前为止对跨种多态现象比较合理的解释，这种学说认为 MHC 谱系早在物种形成以前就已经存在了，然后随着物种的分化而存在于不同的动物上，有些等位基因甚至能存在相当长的时间。Klein（1980）在对家鼠的地理隔离种群和亚种的 MHC 研究中第一次提出跨种进化概念。目前在鱼类（Graser et al，1996），鸟类（Hess & Edwards，2002）以及哺乳类（Klein et al，1993）的某些物种中均发现有这一现象。本研究发现的云豹具有跨种多态性的原因可能是由于猫科动物都是在最近约 1000 万年的时间里产生的（Wayne et al，1991），因为各物种间分歧时间较短，所以在某些物种内仍留有相似乃至相同的等位基因。

参考文献：

Abbas AK，Lichtman AH，Pober JS. 1991. Cellular and Molecular Immunology［M］. New York：Saunders WB and Co.

Aguilar A，Roemer G，Debenham S，Binns M，Garcelon D，Wayne RK. 2004. High MHC diversity maintained by balancing selection in an otherwise genetically monomorphic mammal［J］. *PNAS*，**101**：3490 – 3494.

Bernatchz L，Landry C. 2003. MHC studies in nonmodel vertebrates：What have we learned about natural selection in 15 years［J］. *J Evol Biol*，**16**：363 – 377.

Brown JH，Jardetzky TS，Gorga JC，Stern LJ，Urban RG，Strominger JL，Wiley DC. 1993. Three-dimensional structure of the human class Ⅱ histocompatibility antigen HLA-DR1［J］. *Nature*，**64**：33 – 39.

Crespi BJ，Fulton MJ. 2004. Molecular systematics of Salmonidae：Combined nuclear data yields a robust phylogeny［J］. *Phylogenet Evol*，**31**：658 – 679.

Drake GC，Kennedy LJ，Auty HK. 2004. The use of reference strand-mediated conformational analysis for the study of cheetah（*Acinonyx jubatus*）feline leucocytes antigen class Ⅱ DRB polymorphisms［J］. *Mol Ecol*，**13**：221 – 229.

Elizabeth JG，Oliver RA，Russell GC. 2000. Duplicated DQ haplotypes increase the complexity of restriction element usage in cattle［J］. *J Immunol*，**165**：134 – 138.

Graser R，O'hUigin C，Vineek V，Meyer A，Klein J. 1996. Trans-species polymorphism of class Ⅱ MHC loci in danio fishes［J］. *Immunogenetics*，**44**：36 – 48.

Hedrick PW，Lee RN，Garrigan D. 2002. Major histocompatibility complex variation in red wolves：Evidence for common ancestry with coyotes and balancing selection［J］. *Mol Ecol*，**11**：1905 – 1913.

Hedrick PW，Whittam TS，Parham P. 1991. Heteozygosity at individual amino acid sites：Extremely high levels for HLA-A and -B genes［J］. *PNAS*，**88**：5897 – 5901.

Hess CM，Edwards SV. 2002. The evolution of the major histocompatibility complex in birds［J］. *Bioscience*，**22**：423 – 431.

Hoelzel AR，Stephens JC，O'Brien SJ. 1999. Molecular genetic diversity and evolution at the MHC DQB locus in four species of *Pinnipedes*［J］. *Mol Biol Evol*，**16**（5）：611 – 618.

Hughes AL，Yeager M. 1998. Natural selection at major histocompatibility complex loci of vertebrates［J］. *Annu Rev Genet*，**32**：415 – 435.

Janczewski DN，Modi WS，Stephens JC，O'Brien SJ. 1995. Molecular evolution of mitochondrial 12*S* rRNA and cytochrome *b* sequences in the pantherine lineage of Felidae［J］. *Mol Biol Evol*，**12**（4）：690 – 707.

Jeanmougin F，Thompson D，Gouy MG，Higgins D，Gibson TJ. 1998. Multiple sequence alignment with Clustal X［J］. *Trends Biochem Sci*，**23**：403 – 405.

Johnson WE，O'Brien SJ. 1997. Phylogenetic reconstruction of the Felidae using 16*S* rRNA and NADH-5 mitochondrial genes［J］. *Mol Evol*，**44**：98 – 116.

Kennedy LJ，Ryvar R，Gaskell RM，Addie DA，Willoughby K，Carter SD，Thompson W，Ollier WE，Radford AD. 2002. Sequence analysis of MHC DRB alleles in domestic cats from the United Kingdom［J］. *Immunogenetics*，**54**：348 – 352.

Klein J，Figueroa F. 1986. Evolution of the major histocompatibility complex［J］. *Immunogenetics*，**6**：295 – 386.

Klein J，Satta Y，Takahata N. 1993. Trans-specific MHC polymorphism and the origin of species in primates［J］. *J Med Primatol*，**22**：57 – 64.

Klein J. 1980. Generation of diversity at MHC loci：Implications for t-cell receptor repertoires［A］. In：Fougereau M，Dausset J. Immunology 80［M］. London：Academic Press，239 – 253.

Kumar S，Tamura K，Jakobsen IB，Nei M. 2001. MAGE2：Molecular evolutionary genetics analysis software［A］. In：Bioinformatics［M］. London：Oxford University Press，**17**：1244 – 1245.

Kuwahara Y，Kitoh K，Kobayashi R，Iwata J，Ohne R，Hosokawakana T，Matsumoto Y，Kitagawa H，Sasaki Y. 2000. Genotyping of feline MHC（FLA）Class Ⅱ DRB by PCR-RFLP method using group-specific primers［J］. *J Vet Med Sci*，**62**：1283 – 1289.

Masuda R，Lopez JV，Slattery JP，Yuhki N，O'Brien SJ. 1996. Molecular phylogeny of mitochondrial cytochrome *b* and 12*S* rRNA sequences in the Felidae：Ocelot and domestic cat lineages［J］. *Mol Phylogenet Evol*，**6**（3）：351 – 365.

Mikko S，Andersson L. 1995. Low major histocompatibility complex class Ⅱ diversity in European and North American moose［J］. *PNAS*，**92**：4259 – 4263.

Murray BW，Malik S，White BN. 1995. Sequence variation at the major histocompatibility complex locus DQB in beluga whales（*Delphinapterus leucas*）［J］. *Mol Biol Evol*，**12**（4）：582 – 593.

Nei M，Hughes AL. 1991. Polymorphism and evolution of the major histocompatibility complex loci in mammals［A］. In：Selander R，Clark A，Whittam T. Evolution at the Molecular Level［M］. Sunderland：Sinauer Associates，MA，222 – 247.

Nei M，Kumar S. 2000. Molecular Evolution and Phylogenetics［M］. London：Oxford University Press.

Nino -Vasquez JJ，Vogel D，Rodriguez R. 2000. Sequence and diversity of DRB genes of *Aotus nancymaae*，a primate model for human malaria parasites［J］. *Immunogenetics*，**51**：219 – 230.

Nowell K，Jackson P. 1996. Wild Cats-Status Survey and Conservation Action Plan［M］. Switzerland：IUCN/SSC Cat Specialist Group，IUCN，Gland，55 – 65.

O'Brien SJ，Evermann JF. 1988. Interactive influence of infectious dis-

ease and genetic diversity in natural populations [J]. *Trends Ecol Evol*, **3**: 254 – 259.

O'Brien SJ, Wildt DE, Goldman D, Merril CR, Bush M. 1983. The cheetah is depauperate in genetic variation [J]. *Science*, **221**: 459 – 462.

Packer C, Pusey AE, Rowley H. 1991. Case study of a population bottleneck-lions of the Ngorongoro crater [J]. *Cons Biol*, **5**: 219 – 230.

Rozas J, Sánchez-DelBarrio JC, Messeguer X, Rozas R. 2003. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods [J]. *Bioinformatics*, **19**: 2496 – 2497.

Russello AM, Gladyshev E, Miquelle D, Caccone A. 2004. Potential genetic consequences of a recent bottleneck in the Amur tiger of the Russian Far East [J]. *Cons Genet*, **5**: 707 – 713.

Sambrook J, Russell DW. 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3rd ed [M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Schaschl H, Goodman SJ, Suchentrunk F. 2004. Sequence analysis of the MHC class Ⅱ DRB alleles in Alpine chamois (*Rupicapra r. rupicapra*) [J]. *Dev Comp Immunol*, **28**: 265 – 277.

Shia YC, Bradshaw M, Rutherford MS, Lewin HA, Schook LB. 1995. PCR-based genotyping for characterization of SLA-DQB and SLA-DRB alleles in domestic pig [J]. *Anim Genet*, **26**: 91 – 99.

Slattery JP, O'Brien SJ. 1998. Patterns of Y and X chromosome DNA sequence divergence during the Felidae radiation [J]. *Genetics*, **148**: 1245 – 1255.

Swofford DL. 1998. PAUP *: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (* and other methods), Version 4 [M]. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates.

Wang S. 1998. China Red Data Book of Endangered Animals [M]. Beijing: Science Press, 266 – 269. [汪 松. 1998. 中国濒危动物红皮书·兽类. 北京: 科学出版社, 266 – 269.]

Wayne RK, Valkenburgh BV, O'Brien SJ. 1991. Molecular distance and divergence time in carnivores and primates [J]. *Mol Biol Evol*, **8**: 297 – 319.

Westerdahl H, Wittzell H, Schantz TV. 2000. MHC diversity in two passerine birds: No evidence for a minimal essential MHC [J]. *Immunogenetics*, **52**: 92 – 100.

Yuhki N, O'Brien SJ. 1997. Nature and origin of polymorphism in feline MHC class Ⅱ DRA and DRB genes [J]. *J Immuol*, **158**: 2822 – 2833.

Yuhki N, Eizirik E, Johnson WE, O'Brien SJ. 2000. Sequence diversity of major histocompatibility complex class Ⅱ DRB Exon 2 region of two sister species of the Felidae, Ocelot (*Leopardus pardalis*) and Margay (*Leopardus wiedii*) [DB/OL]. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/

Zheng T, Fei RM, Wu XB. 2005. Phylogeney of 13 Felidae species from China based on partial 12*S* rRNA and Cyt *b* genes sequences [J]. *Acta Zool Sin*, **51** (4): 630 – 639. [郑 涛, 费荣梅, 吴孝兵. 2005. 从 12*S*rRNA 基因和 Cyt *b* 基因部分序列研究 13 种猫科动物的分子系统关系. 动物学报, **51** (4): 630 – 639.]

本刊顾问孙儒泳院士简介



孙儒泳院士

孙儒泳，男。1951 年毕业于北京师范大学生物系。1958 年在原苏联国立莫斯科大学获副博士学位。现任北京师范大学、华南师范大学生命科学学院教授、博士生导师。1993 年当选为中国科学院院士。曾任中国生态学会第三届理事长，国务院学位委员会和国家自然科学基金会生态学科评审组成员，教育部高等学校理科生物学教学指导委员会成员，北京市政府水产科技顾问团成员，《生态学报》和《兽类学报》副主编，《动物学报》和《动物学研究》编委，美国《生理动物学》(*Physiological Zoology*) 编委。

从事生态学教学和科研 40 多年，撰写和参与撰写的专著、译著、高校教材等共 16 种，在国内外学术刊物上发表论文 160 余篇。独著的《动物生态学原理》获第二届高校教材评审全国优秀奖和 1992 年全国教学图书展一等奖。先后主持和参加了 16 项科研项目，获得国家自然科学三等奖、农业部科技进步二等奖等 6 项，并于 1991 年获国务院颁发的政府特殊津贴。

以 8 个季节的实验资料，证明地理上相距仅 110 km 的两个种群间存在着静止代谢率的地理变异，它平行地出现于两种小啮齿类，即生活在草甸中的普通田鼠 (*Microtus arvalis*) 和森林中的欧䶄 (*Clethrionomys glareolus*)，从而为兽类提供了地理物种形成假说的生理生态学证据；同时，提出了地理变异季节相的新概念。研究长爪沙鼠 (*Meriones nguiculatus*) 代谢率随环境温度变化，发现静止代谢率与平均每日代谢率的变化率不同，提出以 20 ℃下 ADMR 为主要参数的 Weiner 日能量收支 (DEB) 模型应予以修正。提出恒温动物的恒温能力的一个新指数，在应用上优于 Ricklef 指数。发现晚成性根田鼠的体温调节能力的胎后发育呈“S”型，可划分为 3 个时期。